

DCtech®

Laboratory Technologies

O Guia definitivo de solução de problemas em HPLC

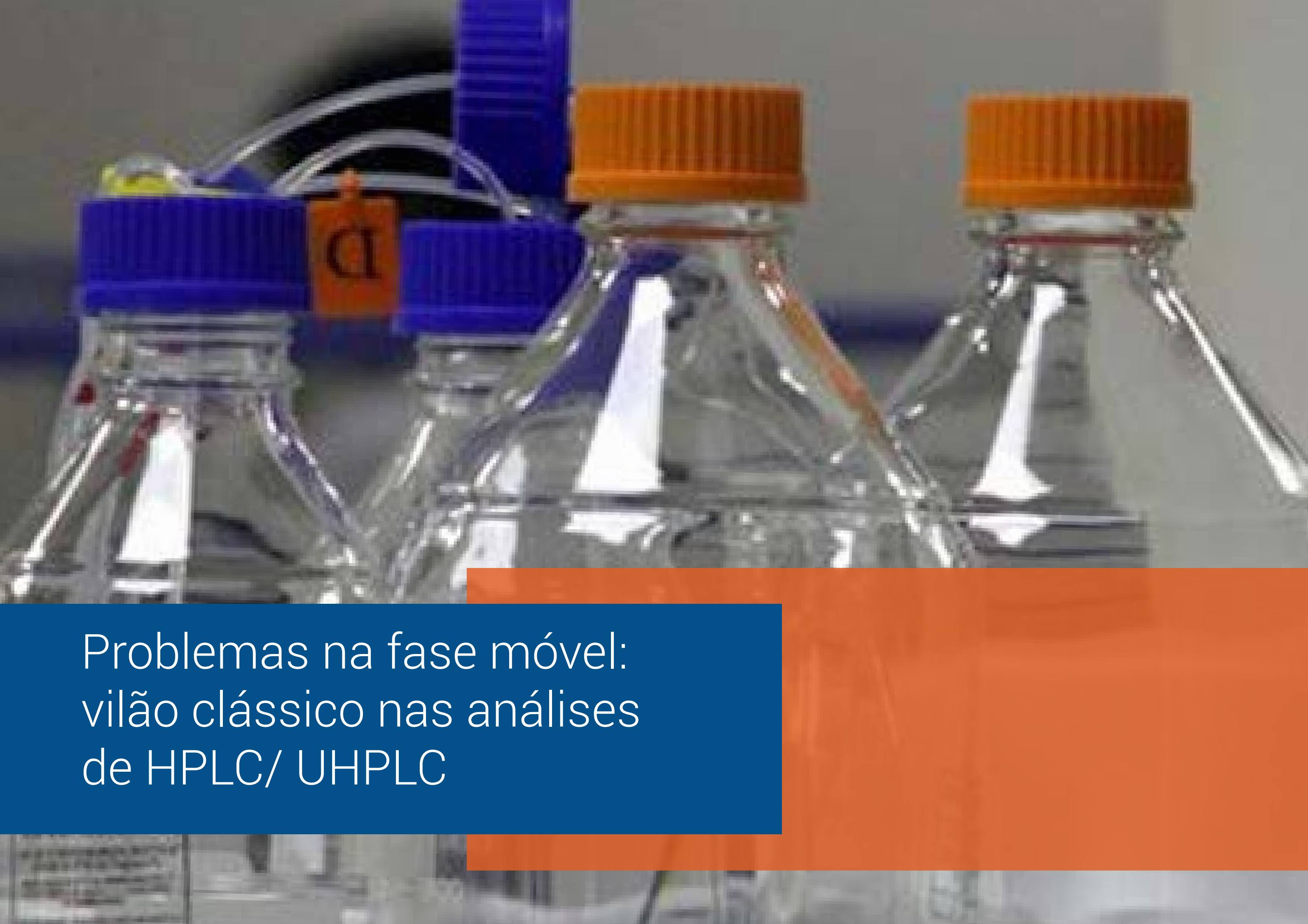
Problemas com colunas, bomba, injetor e detector, fase móvel e muitas dicas para suas análises.



DCtech®
Laboratory Technologies

Índice

Problemas na fase móvel: vilão clássico nas análises de HPLC/ UHPLC 3
Problemas na bomba, no injetor ou no detector HPLC: como identifica-los 5
Coluna HPLC: como evitar problemas nas suas análises 8
Desvio da linha de base / Baseline drift 11
Ruído na linha de base / Baseline noise 13
Pressão de trabalho muito alta na coluna 16
Pressão de trabalho baixa na coluna HPLC 17
Picos fantasmas (picos carregados no branco) 18
Picos negativos HPLC 19
Alteração na altura do pico HPLC 20
Picos HPLC não aparecem ou são muito pequenos 22
Perda de Resolução nos picos HPLC 23
Picos largos HPLC 24
Picos HPLC com cauda frontal 26
Picos divididos 27
Variações no tempo de retenção 28
Cuidados com colunas HPLC e uso de colunas à base de sílica 29



Problemas na fase móvel: vilão clássico nas análises de HPLC/ UHPLC

Os problemas mais comuns que ocorrem em análises de HPLC são baixa sensibilidade e desvios da linha de base, ruído ou picos no cromatograma. Estes fenômenos podem ser normalmente problemas na fase móvel. A DCtech, em conjunto com a Knauer, simplifica para você este vilão e disponibiliza dicas valiosas para sua análise correr sem problemas.

Presença de contaminantes

Contaminantes no eluente são os maiores causadores de problemas, especialmente em análises com gradiente. A linha de base pode subir e picos desconhecidos aparecerem à medida em que a concentração dos contaminantes for subindo. A água é a maior fonte de contaminantes nas análises de fase reversa. Você deve utilizar somente água ultrapura deionizada na preparação de sua fase móvel. Entretanto, muitos deionizadores comuns introduzem contaminantes orgânicos na água. Para remover estes contaminantes, passe a água deionizada através de carvão ativo ou uma coluna preparativa C18. Use somente solventes de grau HPLC, inclusive sais, reagentes de pareamento iônico e modificadores de ácido e base. Limpar solventes de baixa qualidade consome tempo e traços de contaminantes frequentemente se mantém, causando problemas quando você usa detectores UV ou fluorescência de alta sensitividade.

Fungos ou Algas nas soluções tampão

Sabendo-se que muitas soluções tampão promovem o desenvolvimento de fungos e algas, você deve descartá-las se estiverem turvas e prepará-las frescas novamente. Você pode prevenir o crescimento de microrganismos na solução tampão através da adição de uma solução de 100 ppm de azido de sódio às soluções tampão aquosas. Alternativamente, essas soluções tampão podem ser misturadas com 10%, 20% ou mais de um solvente orgânico como metanol, etanol ou acetonitrila.

Presença de bolhas ou gases dissolvidos

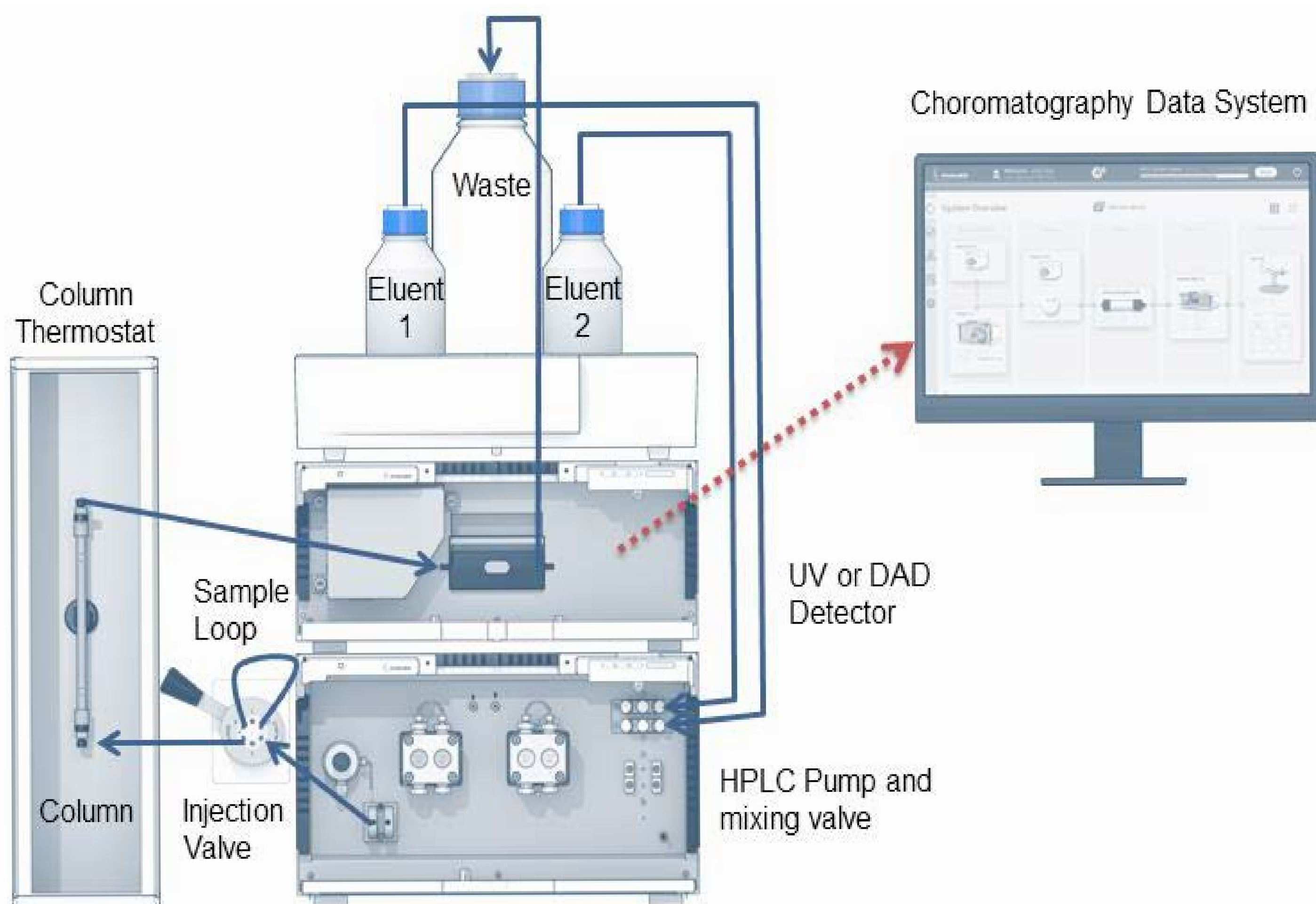
Para prevenir bolhas no sistema, degaseifique a fase móvel previamente ao uso. Recomendamos o uso contínuo de uma unidade degaseificadora. Filtrar a fase móvel através de filtros de 0,2 ou 0,45 µm usando um aparato de filtração à vácuo elimina a presença de gás dissolvido, além de remover partículas que poderiam gerar ruído na linha de base ou entupir a coluna.

Reagentes de pareamento iônico

Use reagentes de pareamento iônico com cautela. O comprimento ótimo de cadeia e a concentração do reagente deve ser cuidadosamente determinada para cada análise. Em geral, aumentando-se o tamanho da cadeia ou concentração resulta em um aumento nos tempos de retenção.

Recomendamos o uso de concentrações de 0,2 a 10 mM. Altas concentrações de acetonitrila (>50%) e alguns outros solventes orgânicos podem precipitar os reagentes de pareamento iônico. Isto pode ser evitado através do uso de soluções tampão contendo sódio na presença de uma cadeia longa de ácidos sulfônicos (por exemplo, dodecil sulfato de sódio), ao invés de soluções tampão contendo potássio. Modificadores voláteis básicos ou ácidos, como trietilamina (TEA) ou ácido trifluoracético (TFA) são úteis quando você deseja recuperar um composto para uma análise subsequente. Estes modificadores também ajudam você a evitar problemas associados com os reagentes de pareamento iônico. Eles podem ser adicionados à solução tampão em concentrações de 0,1 a 1% para TEA e 0,05 a 0,15% para TFA. Aumentando-se a concentração pode-se melhorar o formato dos picos para certos compostos, mas isto alterará os tempos de retenção.

Problemas na bomba, no injetor ou no detector HPLC: como identifica-los



A bomba de HPLC

A bomba de HPLC deve fornecer um fluxo constante de solvente para a coluna em uma ampla gama de condições. As bombas de HPLC da KNAUER incorporam design de pistão duplo.
Os problemas do sistema de bombeamento geralmente são fáceis de se detectar e corrigir.
Alguns dos sintomas mais comuns são variação nos tempos de retenção, linhas de base com ruído ou aparecimento de picos (spikes) no cromatograma.

Vazamentos na bomba

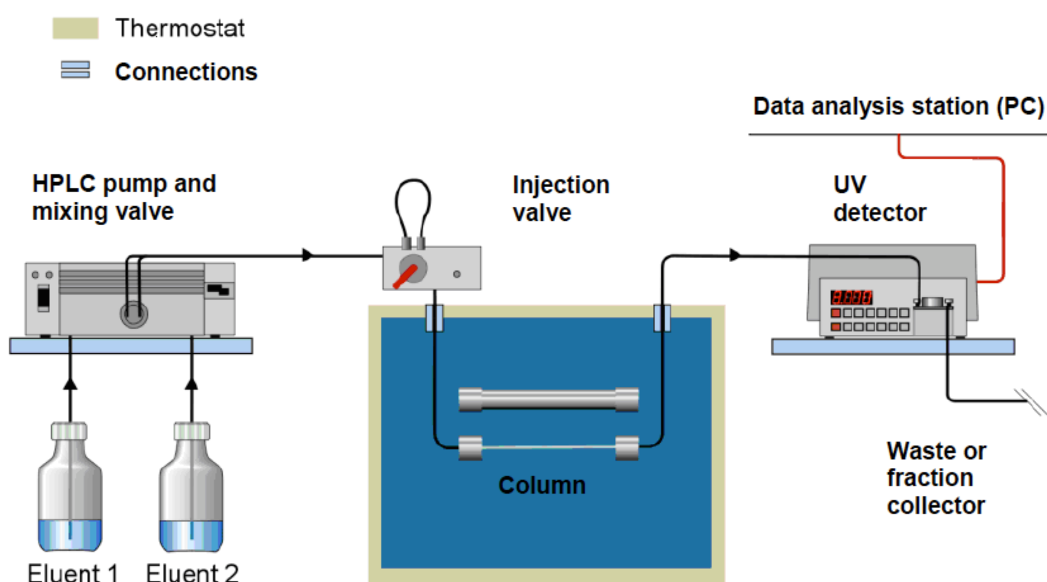
Vazamentos nas conexões ou selos da bomba resultarão em uma cromatografia de baixa qualidade. Um sinal que aponta um vazamento certo é uma formação de sais em uma conexão da bomba. Os sais da solução tampão devem ser lavados diariamente do sistema com água fresca deionizada. Deixe o sistema de HPLC rodando continuamente em fluxo baixo (por exemplo, 0,1 ml/min) para evitar efeitos de cristalização. Para isolar e reparar problemas específicos relacionados ao seu sistema de HPLC, use as seções de solução de problemas e manutenção do manual de operação do equipamento. Os selos da bomba requerem substituição periódica. Você deve realizar manutenção preventiva periódica ao invés de esperar que ocorra um problema.

Check-valves

Outros locais na bomba onde os problemas geralmente ocorrem são as válvulas de retenção (check-valves) no cabeçote da bomba. Você identifica isso, por exemplo, quando a bomba não consegue manter um fluxo ou pressão constante. Se isso acontecer, limpe as válvulas de retenção com isopropanol, por exemplo. Se isso não funcionar, desmonte as válvulas de retenção e limpe-as em um banho de ultrassom usando isopropanol, por exemplo. Em seguida, reinstale as válvulas de retenção no cabeçote da bomba. Certifique-se de que as válvulas estão na direção certa. Se isso não funcionar, substitua as válvulas de retenção.

Condições severas de uso

Fases móveis que possuem sais em alta concentração ou têm o pH muito alto podem reduzir a eficiência da vedação da bomba. Em alguns casos, o uso prolongado de reagentes de pareamento iônico tem um efeito lubrificante nos pistões da bomba que podem produzir pequenos vazamentos nos anéis de vedação. Alguns selos não funcionam bem com determinados solventes. Antes de usar uma bomba em condições severas, leia as especificações do fabricante do instrumento. Para substituir os selos de vedação, consulte a seção de manutenção do manual da bomba.



O injetor HPLC

O injetor introduz rapidamente a amostra no sistema com uma ruptura mínima do fluxo de solvente. Os sistemas HPLC atualmente usam injetores de tubo de carregamento da amostra (loop) variável, tubo de carregamento da amostra fixo e tipo seringa.

Problemas mecânicos

Problemas mecânicos envolvendo o injetor (por exemplo, vazamentos, capilares, selos desgastados) são fáceis de se detectar e corrigir. Use um filtro de linha no sistema para evitar a obstrução do frit da coluna devido à degradação física do selo do injetor.

Compatibilidade entre solventes no sistema

Alturas de pico variáveis, picos divididos e picos largos podem ser causados por tubo de carregamento da amostra não completamente preenchidos, incompatibilidade da solução de limpeza do injetor com a fase móvel ou baixa solubilidade da amostra. Sempre que possível, dissolva e injete amostras na própria fase móvel. Caso contrário, certifique-se de que o solvente de injeção tenha uma força de eluição menor do que a fase móvel. Esteja ciente de que alguns amostradores automáticos usam soluções separadas de lavagem de seringas. Certifique-se de que a solução de lavagem é compatível e mais fraca do que a fase móvel. Isto é especialmente importante quando se alterna entre análises de fase reversa e normal.

O detector HPLC

Vários tipos de detectores estão disponíveis para sistemas de cromatografia líquida. Os mais comuns são os espectrofotômetros ultravioleta de comprimento de onda fixos ou variáveis, o detector de índice de refração e os detectores de condutividade. Os detectores eletroquímicos e de fluorescência são menos utilizados porque são mais seletivos. Os problemas do detector dividem-se em duas categorias: elétrica e mecânica ou óptica. Para problemas elétricos, você deve entrar em contato com o fabricante do instrumento. Os problemas mecânicos ou ópticos geralmente podem ser rastreados até a célula de fluxo. Os problemas relacionados ao detector incluem vazamentos, bolhas de ar e contaminação da célula. Eles geralmente produzem picos, ruídos ou desvios na linha de base ou baixa sensibilidade. Algumas células – especialmente aquelas usadas em detectores de índice de refração – são sensíveis à pressão. As vazões ou as pressões de trabalho que excedem a recomendação do fabricante poderão quebrar a janela da célula. As lâmpadas velhas ou defeituosas, bem como os incorretos aumentos de tempo, ganho ou atenuação do detector irão reduzir a sensibilidade e a altura do pico. Conexões de cabo defeituosas ou invertidas também podem ser a fonte de problemas.

Coluna HPLC: como evitar problemas nas suas análises

Proteja sua coluna HPLC pra ela durar mais tempo!

Apesar de não ser parte integral do equipamento, filtros de entrada do solvente, filtros de entrada do injetor e da coluna, colunas de saturação e pré-colunas minimizam muitos problemas associados a separações complexas. Nós recomendamos que todas as amostras sejam filtradas por filtros de seringa de 0,45 µm ou 0,2 µm. O uso de pré-colunas integradas é fortemente recomendado também.

Filtros e pré-colunas evitam que partículas e componentes fortemente retidos se acumulem na coluna analítica. As partículas de sílica em uma coluna HPLC de saturação se dissolvem em fases móveis de pH alto, protegendo o enchimento à base de sílica na coluna analítica. A vida útil desses produtos descartáveis depende da composição da fase móvel, da pureza da amostra, do pH, etc. As colunas Knauer são produzidas em diferentes tamanhos e modelos. Uma grande variedade de enchimentos também está disponível, mas todos têm o mesmo propósito – a separação.

Confira nossas colunas nesse link.

O problema mais comum associado às colunas analíticas é a deterioração.

Isso é verdade, independentemente de a coluna ter fase reversa ou normal, troca iônica, afinidade, interação hidrofóbica, exclusão de tamanho e empacotamento baseado em resina ou sílica. Os sintomas de deterioração são formato ruim dos picos, picos indesejados, picos divididos, ombros, perda de resolução, diminuição dos tempos de retenção e aumento da pressão de trabalho. Estes sintomas indicam que contaminantes se acumularam nos frits ou entrada de colunas, ou existem vazios, canais ou depressões no enchimento.

A deterioração é mais evidente nas colunas de alta eficiência. Por exemplo, um enchimento de 3 µm protegido por frits de 0,5 µm é mais suscetível a entupimentos do que um enchimento de 5 ou 10 µm protegido por frits de 2 µm ou maior. A proteção adequada da coluna e a preparação da amostra apropriada são essenciais para que o máximo de cada coluna possa ser dado. A sobrecarga de uma coluna pode causar picos de formato ruim e outros problemas.

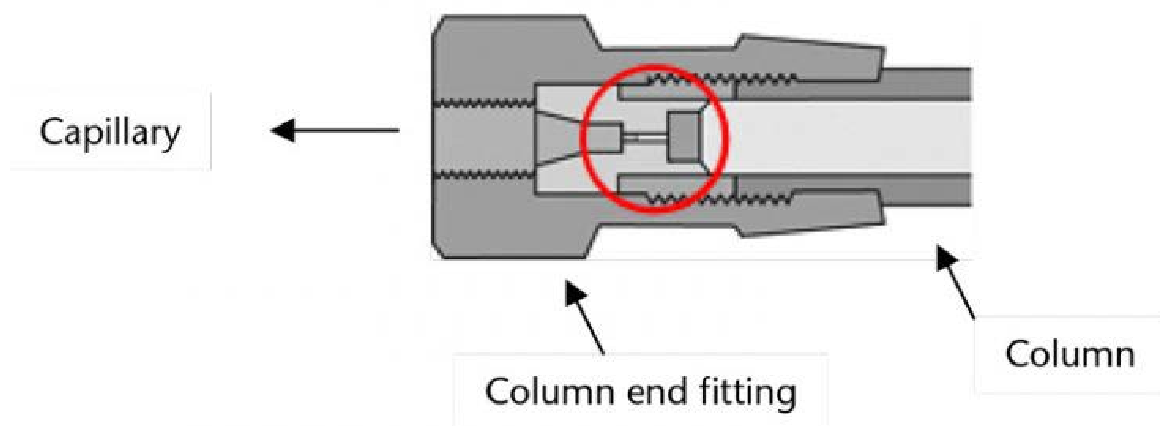
A capacidade da coluna depende de muitos fatores, mas os valores típicos são:

- Colunas analíticas (250mm x 4mm) 0.02 – 2.0mg
- Colunas semi-preparativas (250mm x 8mm) 0.08 – 8.0mg
- Colunas preparativas (250mm x 20mm) 0.5 – 50.0mg

Problemas de encaixe da coluna HPLC

Os vazamentos são um problema comum nas análises de HPLC e UHPLC. Para minimizar vazamentos no sistema, evite trocar peças e acessórios de diferentes fabricantes. Os encaixes incompatíveis podem ser forçados inicialmente a encaixar, mas depois de repetidas conexões, podem vazar.

Se a troca for absolutamente necessária, use adaptadores apropriados e verifique todas as conexões por vazamentos antes de prosseguir. Outro problema que ocorre quando há troca de peças por de outro fabricante é o aumento do volume morto (figura abaixo).



Especialmente em UHPLC, o volume morto deve ser minimizado para que se possa obter o alto desempenho requisitado do sistema.

Uma entrada de coluna entupida é outro problema comum de HPLC. Para minimizar este problema desde o início, use uma pré-coluna. Para limpar a entrada da coluna, primeiro desconecte e inverta a coluna. Conecte-a à bomba (mas não ao detector!), e bombeie o solvente em baixa vazão (0,5 ml/min). Cerca de 100 ml de solvente devem ser suficientes para desalojar pequenas quantidades de material particulado no frit de entrada da coluna. Se isso não funcionar, aumente a vazão cuidadosamente para 1 ml/min. Avalie o desempenho da coluna limpa usando uma amostra de picos conhecidos.

Recomendações especiais para análises com coluna em série

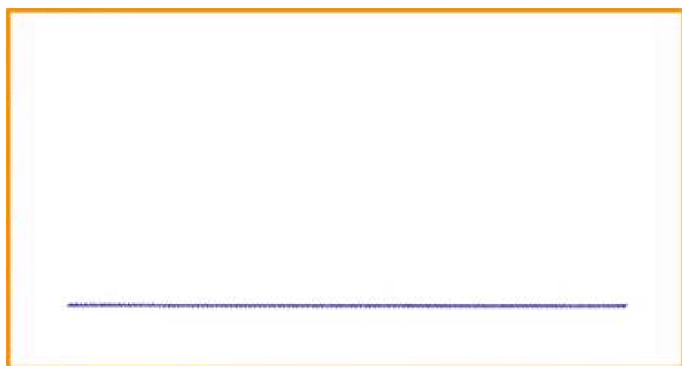
O acoplamento de colunas torna-se cada vez mais importante, pois é uma ferramenta útil para problemas complexos de separação. Em um sistema convencional de HPLC ou UHPLC, a análise com colunas em série pode ser facilmente arranjada sem nenhum equipamento adicional. Mas há alguns fatos que devem ser observados: especialmente no UHPLC, diminuir-se o volume morto é realmente importante.

Quando duas colunas são acopladas, capilares adicionais são necessários para conectar as colunas.

É óbvio que o capilar aplicado tem que ser tão curto e com o menor diâmetro interno possível. Se você não contar com isso, a separação realizada na primeira coluna pode ser novamente misturada no capilar. Para evitar este problema contraproducente, mantenha especialmente neste local os capilares mais curtos possíveis e com um pequeno diâmetro interno (0,1 mm ID, por exemplo, é típico para UHPLC).

Solução de Problemas HPLC
Desvio da linha de base / Baseline drift

Linha de base normal



Problema de desvio na linha de base (baseline noise)



Desvio de base / Baseline drift

Causas prováveis	Solução de problemas
1. Flutuação da temperatura da coluna. (Mesmo pequenas alterações causam elevação e queda cíclica da linha de base, detectores de índice de refração e de condutividade e detectores de UV com alta sensibilidade são afetados com maior frequência).	1. Controle a temperatura da coluna e da FM, utilize trocador de calor antes do detetor.
2. A fase móvel não é homogênea. (Desvio geralmente para maior absorbância, em vez de padrão cíclico de flutuação de temperatura.)	2. Use solventes de grau hplc, sais e aditivos de alta pureza. Degaseifique a FM antes de usar e aplique um degaseificador durante o uso.
3. Contaminante ou acumulação de ar na célula do detector.	3. Lave a célula com metanol ou outro solvente forte. Se necessário limpe a célula com solução 1N HNO_3 (nunca com HCl).
4. Linha de saída conectada depois do detector. (Alta pressão fissura a janela da célula, produzindo linha de base com ruído.)	4. Desconecte ou substitua a linha. Consulte o manual do detector para substituição da janela.

Causas prováveis	Solução de problemas
5. Problema de mistura da fase móvel ou mudança na taxa de fluxo.	5. Corrija a composição ou vazão. Periodicamente, monitore a composição e a vazão para evitar o problema.
6. Balanceamento lento da coluna, especialmente quando se muda a fase móvel.	6. Lave a coluna com solvente de resistência intermediária, corra 10-20 volumes de coluna com a nova fase móvel através da coluna antes da análise.
7. Fase móvel contaminada, deteriorada ou preparada com materiais de baixa qualidade.	7. Verifique a composição da fase móvel.
8. Os materiais fortemente retidos na amostra (alto k') podem eluir como picos muito largos e um desvio para cima da linha de base pode aparecer. (Análises com gradiente podem agravar o problema.)	8. Use a pré-coluna. Se necessário, lave a coluna com solvente forte entre as injeções ou periodicamente durante as análises.
9. Detector não ajustado para FM reciclada.	9. Faça um reset na linha de base. Use materiais novos quando a banda de detecção dinâmica for excedida.
10. Detector (UV) não ajustado na absorbância máxima, mas na inclinação da curva.	10. Ajustar no comprimento de onda da absorbância máxima.
11. Em laboratórios com temperaturas mais altas (28ºC), ocorrem mais instabilidades de linha de base, se comparado a laboratórios com temperaturas mais baixas (22ºC) na utilização de ACN / Água ou gradientes de tampão e misturas.	11. Temperaturas mais elevadas podem aumentar a polimerização de ACN.

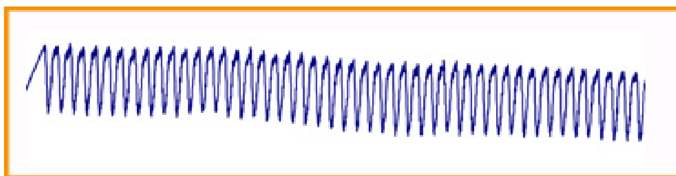


Solução de Problemas HPLC Ruído na linha de base / Baseline noise

Linha de base normal

Problema de desvio na linha de base (baseline noise)







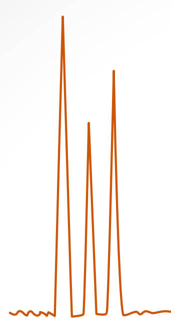


Ruído na linha de base hplc / Baseline noise

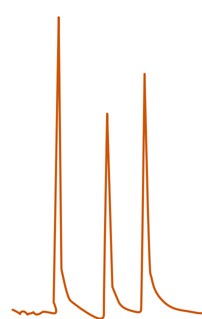
Seguindo no detalhamento dos problemas indicados em nossa matriz de resolução de problemas em hplc, tratamos agora o problema de Ruído na linha de base hplc.

Veja as possíveis causas e soluções em dois diferentes casos: Ruído cíclico e Ruído irregular.

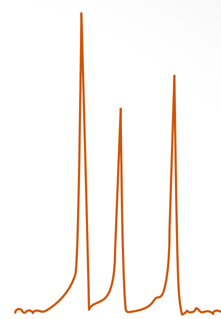
Se você ainda não tem a matriz em sua bancada, baixe aqui!



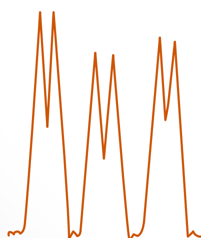
Picos Normais



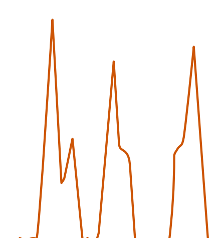
Picos com Cauda



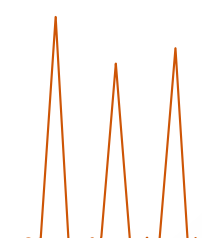
Picos com Frontes



Picos Divididos



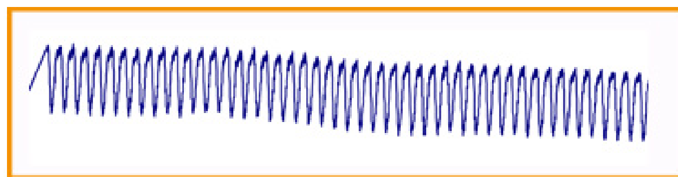
Picos com Ombros



Picos Largos

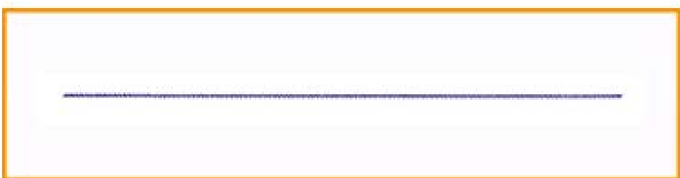
Caso 1: Ruído cíclico na linha de base





Problemas	Soluções
Ar na fase móvel, célula do detector ou bomba.	Degaseifique a fase móvel. Lave o sistema para remover o ar do detector ou bomba.
Mistura incompleta da fase móvel.	Misture a fase móvel manualmente ou use solvente menos viscoso.
Efeito da temperatura (coluna a alta temperatura, detector sem aquecimento).	Reduza a variação de temperatura ou adicione um trocador de calor.
Pulsação na bomba.	Limpe ou troque as válvulas de retenção (check valves) do cabeçote da bomba. Se o problema ainda persistir, incorpore um amortecedor de pulsos no sistema.
Pressão próxima ao máximo.	Minimize a pressão de trabalho reduzindo o fluxo de vazão ou aquecendo a coluna.

Caso 2: Ruído irregular na linha de base





Problemas	Soluções
Vazamento.	Confira se não existem conexões soltas no sistema. Verifique se há vazamentos nas bombas, formação de cristais de sal ou barulhos incomuns. Troque os selos da bomba se necessário.

Gradiente: fase móvel contaminada, deteriorada ou preparada com materiais de baixa qualidade.	Verifique o preparo da fase móvel.
Problemas eletrônicos no detector.	Isole eletronicamente o detector. Consulte o manual de instruções para corrigir o problema.
Ar preso no sistema.	Lave o sistema com um solvente forte.
Bolhas de ar no detector.	Purgue o detector. Instale um pressurizador/ restritor de fluxo depois do detector. Verifique o manual de instruções particularmente para detectores RID. Pressão de trabalho excessiva pode causar a fissura da célula de fluxo.
Célula do detector contaminada. (Até pequenas quantidades de contaminantes podem gerar ruídos).	Limpe a célula.
Lâmpada fraca do detector.	Troque a lâmpada.
Vazamento do enchimento da coluna.	Troque a coluna e limpe o sistema.



Solução de Problemas HPLC | Pressão de trabalho muito alta na coluna

Pressão de trabalho muito alta na coluna

Quando a pressão na coluna de HPLC fica muito alta, há distorções nas análises, saiba como corrigir:

Normal

Problema

Causas prováveis	Solução de problemas
1. Problema com bomba, injetor, filtro de linha ou tubulações.	1. Desconecte a coluna do sistema e substitua com os conectores de diâmetro interno de no mínimo 0,010” para reconectar o injetor ao detector. Corra a bomba a uma vazão alta (2-5 mL/min). Se a pressão é mínima, veja o problema seguinte. Se não, isole a causa raiz através de sistematicamente eliminar os componentes do sistema. Comece com o detector seguindo em direção a bomba.
2. Coluna obstruída.	2. Se for o caso, remova a pré-coluna e verifique a pressão. Substitua a pré-coluna se necessário. Se a coluna estiver obstruída, inverta a coluna e lave-a enquanto estiver desconectada do detector. Se o problema persistir, use o procedimento de regeneração apropriado conforme recomendação do fabricante. Se o problema ainda persistir, substitua a coluna.
3. Fase móvel errada.	3. Verifique a fase móvel. Verifique o preparo da fase móvel: mesmo pequenas alterações na sua composição podem afetar a pressão de trabalho.

Pressão de trabalho baixa na coluna HPLC

Agora que você já sabe o que fazer caso a pressão de trabalho fique muito alta, veja as possíveis causas e soluções caso o inverso ocorra: Pressão de trabalho baixa na coluna HPLC.

Detalhamos abaixo as possíveis causas e como resolvê-las, acompanhe:

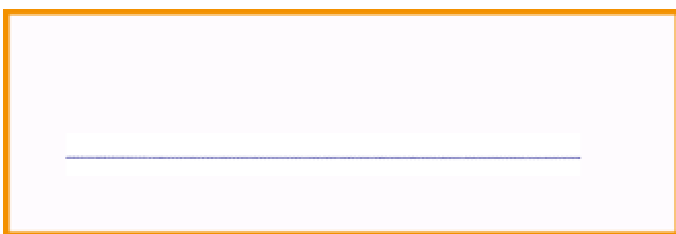
Normal

Problema

Causas prováveis	Solução de problemas
1. Vazamento	Verifique todo o sistema por conectores frouxos. Verifique se há vazamentos na bomba, formação de cristais de sal e ruídos incomuns. Se necessário, troque os selos da bomba.
2. Fluxo da fase móvel interrompido ou obstruído	Verifique o nível de fase móvel nos reservatórios. Verifique o fluxo ao longo do sistema. Examine de forma especial o tubo de carregamento de amostra por entupimento ou bolhas de ar. Certifique-se que os componentes da fase móvel são miscíveis e que a fase móvel foi degaseificada.
3. Ar preso no cabeçote da bomba, revelado em variações na pressão	Desconecte o capilar da entrada da coluna e verifique o fluxo. Purgue a bomba com uma vazão alta (por exemplo, 10 mL/min), se necessário, faça uma drenagem manual com seringa.
4. Vazamento no conector de entrada da coluna	Reconecte a coluna e bombeie solvente através da coluna. Se a pressão continuar baixa, verifique se há vazamentos na entrada e saída da coluna.
5. Ar preso no sistema em qualquer outro lugar	Desconecte a coluna e purgue o sistema. Reconecte a coluna. Se o problema persistir, lave o sistema com 100% de metanol ou isopropanol.
6. Selo da bomba desgastado causando vazamentos em volta do cabeçote da bomba	Substitua o selo. Se o problema persistir, substitua o pistão e o selo.
7. Preparo errado da fase móvel	Verifique a fase móvel. Verifique o preparo da fase móvel: mesmo pequenas mudanças na composição podem afetar a pressão de trabalho.

Solução de Problemas HPLC | Picos fantasmas (picos carregados no branco)

Regular (branco)



Problema (branco)



Picos fantasma (picos carregados no branco)

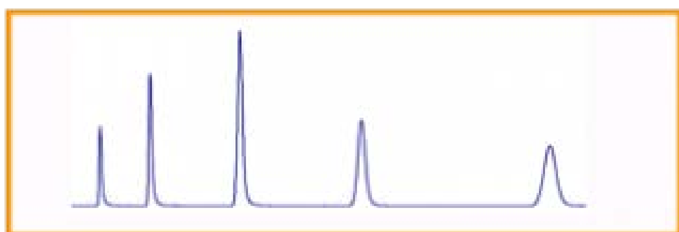
Você sabe o que fazer quando aparecem picos inesperados ou picos fantasmas em sua análise HPLC?

Veja aqui uma solução rápida para você testar quando isso ocorrer novamente:

Causas prováveis	**Solução de problemas**
1. Contaminação do injetor ou coluna.	Lave o injetor entre as análises. Se necessário, corra um solvente forte pela coluna para remover contaminações presas de análises anteriores. Inclua uma lavagem no final da corrida com gradiente para remover compostos que fiquem retidos na coluna. Quando for possível, use a fase móvel como solução do injetor. Carregamentos da solução de injetor também podem causar picos fantasmas.

Solução de Problemas HPLC
Picos negativos HPLC

Normal



Problema



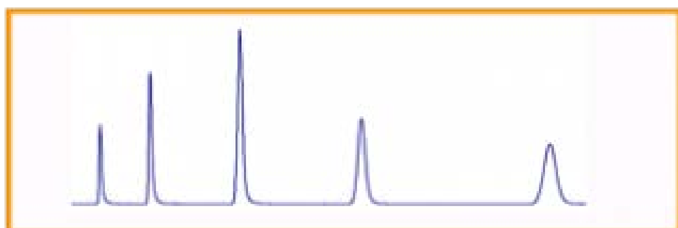
Picos negativos HPLC

Você já deve ter visto esse problema: picos negativos em sua análise HPLC, ele é um dos problemas que aparecem em nossa matriz de resolução de problemas em HPLC.

Nesse artigo, nós detalhamos as possíveis causas e formas de resolver esse problema:

Causas prováveis	**Solução de problemas**
1. Polaridade invertida.	Confira a polaridade.
2. Índice de refração do soluto é menor que o da fase móvel (detector RID).	Use a fase móvel com menor índice de refração ou com polaridade invertida.
3. Solvente da amostra e fase móvel diferem muito em composição (detector UV).	Ajuste ou altere o solvente da amostra. Sempre que possível, dilua a amostra na fase móvel.
4. Fase móvel tem mais absorbância que os componentes da amostra ao comprimento de onda no UV (picos vazios).	Altere o comprimento de onda ou use uma fase móvel que não tenha uma absorbância para o comprimento de onda escolhido.

Solução de Problemas HPLC
Alteração na altura do pico HPLC

Normal	Problema
	

Alteração na altura do pico HPLC para um ou mais picos

A alteração da altura do pico HPLC, seja para um ou mais picos podem ocorrer por diversas causas, como: eficiência da coluna, mudança no processo de separação da amostra, vazamento, volume inconsistente, configuração, lâmpada ou contaminação no detector.

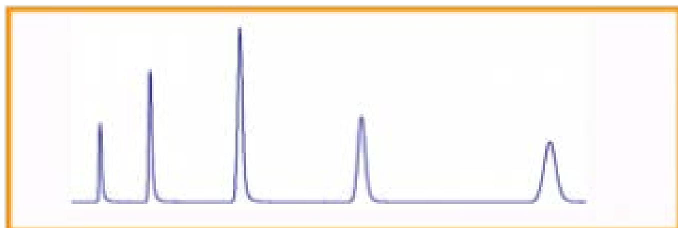
Nesse artigo, detalhamos essas possíveis causas e indicamos as formas de resolver:

Causas prováveis	Solução de problemas
1. Um ou mais componentes da amostra deterioraram ou a eficiência da coluna caiu.	Use uma amostra fresca ou padrão para confirmar a origem do problema. Se alguns ou todos os picos ainda estão menores que o esperado, substitua a coluna. Se a nova coluna melhorar os resultados, tente recondicionar a coluna antiga, seguindo o procedimento do fabricante. Se a performance da coluna antiga não melhorar, será necessário seu descarte.
2. Mudanças no processo de preparação da amostra. Diferenças na matriz podem afetar a altura dos picos.	Verifique o processo de preparação de amostra e elimine os efeitos de matriz como possível causa do problema.

3. Vazamento, especialmente entre a saída do injetor e a entrada da coluna (tempo de retenção também pode mudar).	Verifique o sistema por conexões soltas. Verifique se há vazamento na bomba, formação de cristais de sal e barulhos incomuns. Troque os selos da bomba se necessário.
4. Volume de amostra inconsistente.	Certifique-se que as amostras são tem volumes consistentes. Para um determinado volume do tubo de carregamento da amostra, utilize de 2 a 3 vezes o seu volume em amostra para certificar-se de que o tubo de carregamento está completamente cheio. Certifique-se que os vials na bandeja do amostrador automático estão com volume suficiente de amostra. Verifique nos injetores tipo seringa por bolhas de ar. Em sistemas com um passo de lavagem ou limpeza, certifique-se que a solução de lavagem não se precipita em contato com os componentes da amostra.
5. Detector ou configuração do detector sofreu alteração.	Verifique as configurações do detector.
6. Lâmpada do detector fraca.	Substitua a lâmpada.
7. Contaminação na célula do detector.	Limpe a célula.

Solução de Problemas HPLC | Picos HPLC não aparecem ou são muito pequenos

Normal



Problema



Picos HPLC não aparecem ou são muito pequenos

Eventualmente, os picos HPLC de sua análise não aparecem ou são menores do que o esperado. Nesse caso, você pode recorrer às hipóteses e soluções que listamos abaixo:

Causas prováveis	Solução de problemas
1. Lâmpada do detector desligada.	Ligue a lâmpada.
2. Fio solto ou rompido entre o detector e o computador.	Verifique as conexões elétricas.
3. Sem fluxo de fase móvel.	Inicie a bomba. Verifique o nível de fase móvel nos reservatórios. Verifique o fluxo através do sistema. Examine o tubo de carregamento da amostra para verificar se há obstrução ou ar. Certifique-se que os componentes da fase móvel são miscíveis e a fase móvel foi apropriadamente degaseificada. Verifique o sistema por conexões soltas. Verifique se há vazamentos na bomba, formação de cristais de sal ou barulhos estranhos. Troque os selos da bomba se necessário. Desconecte a tubulação na entrada da coluna. Verifique o fluxo. Purgue a bomba a alta pressão (por exemplo, 5mL/ min), purgue o sistema se necessário (cada cabeçote da bomba separadamente). Se o sistema tem válvula de retenção (check valve), afrouxe a válvula para deixar o ar sair. Se o problema persistir, lave o sistema com !00% de metanol ou isopropanol. Se o problema ainda persistir, entre em contato com o fabricante.

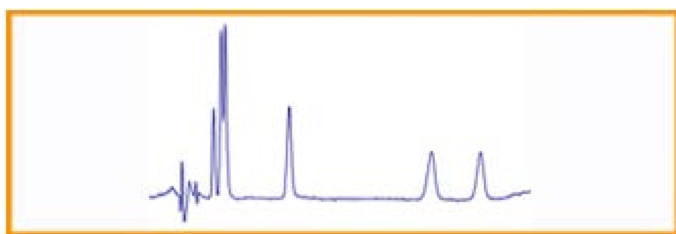
4. Sem amostra ou amostra degradada.	Certifique-se que os vials no amostrador automático tem líquido suficiente e que a válvula do injetor está funcionando bem. Avalie o desempenho do sistema com um padrão recentemente preparado para confirmar a amostra como fonte do problema
5. Configurações muito altas no detector ou software.	Verifique atenuação ou configurações de ganho.

Solução de Problemas HPLC
Perda de Resolução nos picos HPLC

Regular



Problema

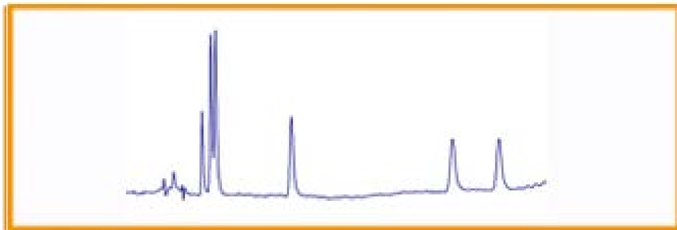


Perda de Resolução nos picos HPLC

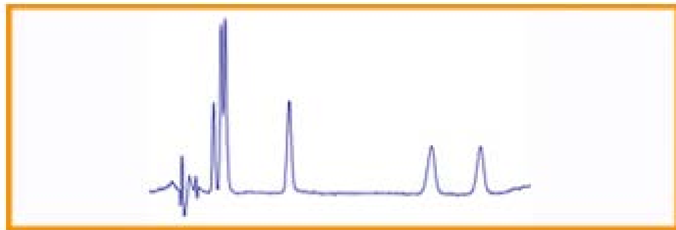
Saiba como resolver o problema de perda de resolução nos picos HPLC! Quando isso ocorrer com você, tente resolver com base nas hipóteses e soluções que listamos abaixo:

Causas prováveis	Solução de problemas
1. Fase móvel contaminada ou deteriorada (causando mudanças no tempo de retenção).	Verifique a preparação da fase móvel.
2.Coluna ou pré-coluna obstruída.	Se for o caso, remova a pré-coluna e recomece a análise. Substitua a pré-coluna se necessário. Se a coluna estiver entupida, inverta e lave a coluna. Se o problema persistir, a coluna pode estar entupida com contaminantes fortemente retidos. Utilize o processo de regeneração apropriado. Se o problema persistir, troque a coluna.Lâmpada do detector desligada.

Regular



Problema



Problema no formato dos picos HPLC – Picos largos

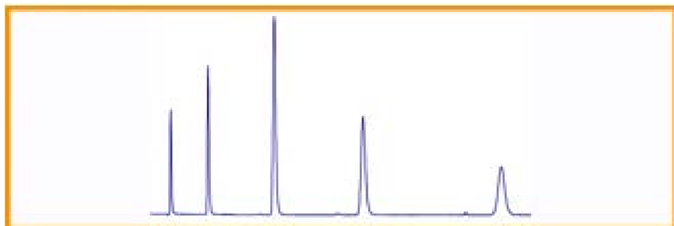
Eventualmente, em sua análise HPLC, você encontra algum problema no formato dos picos.
Neste post vamos analisar os picos largos.
Experimente resolver esse problema com base no neste guia:

Causas prováveis	Solução de problemas
1. Composição da fase móvel mudou.	Prepare nova fase móvel.
2. Vazão da fase móvel está muito baixa. Não está na curva ótima de van Deemter.	Ajuste a vazão.
3. Vazamento, em especial entre a coluna e o detector. Picos ficarão mais largos com altura menor!	Verifique o sistema por conexões soltas. Verifique se há vazamentos na bomba, formação de cristais de sal ou barulhos incomuns. Troque os selos da bomba se necessário.
4. Configurações do detector incorretas.	Ajuste as configurações do detector.
5. Efeitos extra-coluna: 1. Sobrecarregamento da coluna. Picos ficarão largos com altura maior. 2. Tempo de resposta do detector ou volume de célula muito grande. 3. Tubulação entre a coluna e o detector é muito longa ou seu diâmetro muito largo. 4. Tempo de resposta do software muito alto.	Comentários: 1. Injete volumes semelhantes ou diluições da amostra (por exemplo: 1:10, 1:100). 2. Reduza o tempo de resposta ou use uma célula menor. 3. Use uma tubulação de 0,007 – 0,010 " de diâmetro interno, com tubulações menores 4. Reduza tempo de resposta

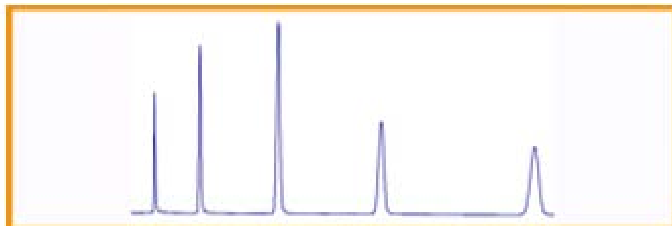
6. Concentração do tampão muito baixa. Os picos ficarão largos sem cauda, etc.	Aumente a concentração.
7. Pré-coluna contaminada.	Troque a pré-coluna.
8. Coluna contaminada/ muito usada.	Substitua a coluna com uma coluna nova do mesmo tipo.
9. Vazio na entrada da coluna.	Substitua a coluna.
10. O pico representa dois ou mais compostos com pouca resolução.	Troque o tipo de coluna para melhorar a separação.
11. Temperatura da coluna muito baixa.	Aumente a temperatura. Não exceda a temperatura recomendada (45oC para Eurospher e 90oC para Eurokat).



Regular



Problema



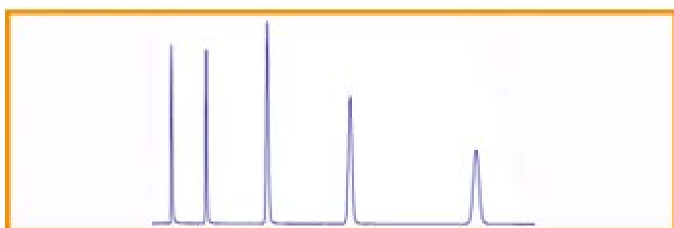
Problema no formato dos picos HPLC – Picos HPLC com cauda frontal

Para resolver esse problema no formato do pico, veja se o problema é interferência ou algum componente da amostra, sobrecarga da coluna ou se o solvente é inconpatível e use as dicas a seguir:

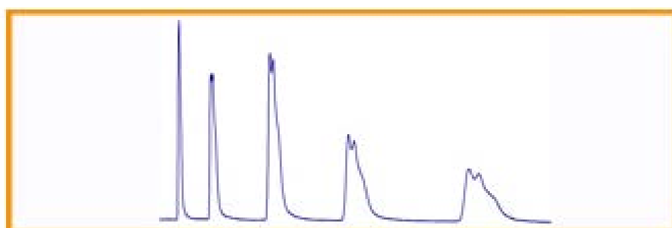
Causas prováveis	**Solução de problemas**
1. Interferência na amostra.	Verifique o desempenho da coluna com os padrões.
2. Ombro ou subida gradual da linha de base antes de um pico principal pode significar outro componente da amostra.	Aumente a eficiência ou mude a seletividade do sistema para melhorar a resolução. Tente outro tipo de coluna se necessário.
3. Sobrecarga da coluna.	Injete um volume menor de amostra ou diluições da amostra (por exemplo, 1:10 ou 1:100).
4. Solvente da amostra incompatível com a fase móvel.	Ajuste o solvente: sempre que possível, injete amostras dissolvidas em fase móvel. Lave colunas de fase de ligações polares com 200mL de acetato de etil grau HPLC, e então com solvente de polaridade intermediária antes das análises.

Solução de Problemas HPLC
Picos divididos

Regular



Problema



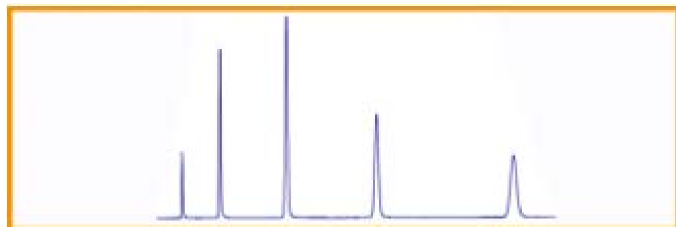
Problema no formato dos picos HPLC
Picos divididos

Use as dicas a seguir para resolver esse problema no formato do pico:

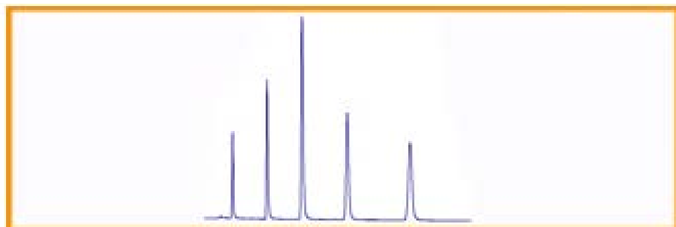
Causas prováveis	Solução de problemas
1. Contaminação da coluna ou pré-coluna.	Remova a pré-coluna se for o caso e recomece a análise. Substitua a pré-coluna se necessário. Se a coluna estiver obstruída, inverta e lave a coluna. Se o problema persistir, coluna pode estar obstruída com contaminantes fortemente retidos. Use o procedimento de regeneração apropriado. Se o problema persistir, substitua a coluna.
2. Solvente da amostra incompatível com a fase móvel.	Ajuste o solvente. Sempre que possível, utilize o próprio solvente da fase móvel na preparação das amostras.
3. Pequeno volume vazio na entrada da coluna.	Substitua a coluna.
4. Filtro parcialmente bloqueado.	Substitua o filtro.
5. O enchimento da coluna está quebrado.	Substitua a coluna.

Solução de Problemas HPLC
Variações no tempo de retenção

Regular



Problema



Problema no formato dos picos HPLC – Variações no tempo de retenção

Para resolver esse problema no formato do pico, veja se a questão é uma das listadas abaixo e siga os passos para resolvê-la:

Causas prováveis	Solução de problemas
1. Vazamento.	Verifique se o sistema não apresenta conexões soltas. Verifique se há vazamento na bomba, formação de cristais de sal ou barulhos incomuns. Troque os selos da bomba se necessário.
2. Mudança na composição da fase móvel. Pequenas mudanças podem levar a grandes mudanças nos tempos de retenção.	Verifique o preparo da fase móvel. Se a fase móvel é misturada em um equipamento, realize a mistura manualmente e alimente a fase móvel a partir de um único reservatório.
3. Ar preso na bomba. Tempos de retenção aumentam e diminuem em tempos aleatórios.	Purgue o ar do cabeçote da bomba ou válvula de retenção. Troque os selos da bomba se necessário. Certifique-se que a fase móvel foi degaseificada.
4. Flutuações na temperatura da coluna.	Utilize um forno de coluna confiável ou isole termicamente a coluna.
5. Sobrecarga da coluna. Tempos de retenção geralmente diminuem quando a massa de soluto injetada na coluna excede a capacidade da coluna.	Injete um volume menor de amostra ou trabalhe com suas diluições.
6. Solvente da amostra incompatível com a fase móvel.	Ajuste o solvente. Sempre que possível, utilize o próprio solvente da fase móvel na preparação das amostras.
7. Problema na coluna. Não é uma causa comum de retenção instável. Conforme a coluna envelhece, tempos de retenção vão diminuindo gradativamente.	Substitua a coluna por uma nova do mesmo tipo para confirmar que a causa do problema é a coluna. Descarte a coluna antiga se os procedimentos de regeneração não forem bem-sucedidos.

Cuidados com colunas HPLC e uso de colunas à base de sílica

Os cuidados com colunas HPLC e o uso apropriado de uma coluna de cromatografia líquida é extremamente importante para a sua vida útil e, consequentemente, para a qualidade da sua análise de HPLC.

Este post irá lhe dar algumas dicas sobre o uso, limpeza e armazenamento de colunas de HPLC e UHPLC. Estas diretrizes dependerão da natureza do suporte cromatográfico e da química de superfície da fase estacionária correspondente.

Cada coluna Knauer é individualmente empacotada e testada para garantir um desempenho confiável. O certificado de teste que acompanha a coluna inclui um cromatograma teste e dados específicos da coluna com relação ao seu desempenho. O número de série da sua coluna está registrado no certificado assim como no seu rótulo.

Para garantir que a coluna possa lhe prover resultados cromatográficos confiáveis, por favor siga as diretrizes abaixo.

Instalação da coluna

Por favor manuseie a coluna com cuidado, cada queda ou choque pode danificar o seu empacotamento do seu recheio. A coluna é entregue de fábrica com acabamentos de PEEK nas suas extremidades. Remova os acabamentos de PEEK antes da instalação da coluna.



Lave todos os capilares com um solvente compatível antes do uso da coluna. Quando a coluna é entregue, ela contém o solvente listado no seu certificado de teste (a coluna também é armazenada com esse solvente no seu recheio para sua segurança). Certifique-se que sua fase móvel seja compatível com o solvente de estocagem. Se não, lave a coluna com um solvente intermediário que seja compatível com ambos solventes.

O recomendado é o isopropanol. O sentido do fluxo é dado por uma seta no rótulo da coluna.

Primeiramente, conecte a coluna somente ao injetor, lave o sistema e a coluna em um fluxo baixo e gradualmente aumente o fluxo até o valor desejado. Finalmente, depois de aproximadamente 10 minutos, conecte a coluna ao seu detector. Este procedimento evitará a formação de bolhas na célula de fluxo.

Antes do início de qualquer análise, verifique se há vazamentos observando a pressão de trabalho ou usando uma unidade controladora de fluxo.

Estabilidade de pH

Em geral, colunas à base de sílica são estáveis entre o pH de 2 e 8.

Quando o pH for medido, ele deve ser feito no meio aquoso antes de misturar o eluente com os solventes orgânicos. Isso dará uma medida mais precisa de pH que medindo o pH em um meio de uma mistura aquosa e orgânica. Algumas colunas de cromatografia líquida podem ser utilizadas fora desse intervalo de pH.

A nova química de ligação permite a operação com o pH entre 1 e 12 para algumas fases estacionárias. Entretanto, verifique a informação do fabricante primeiro antes de utilizar uma coluna à base de sílica fora da faixa do pH de 2 a 8.

Estabilidade mecânica

Fases estacionárias baseadas em sílica com tamanho de poro < 200 A são mecanicamente muito estáveis.

Fases estacionárias com tamanho de partículas de 5 µm ou maiores podem ser usados na rotina com até 6.000 psi sem qualquer problema. Fases em HPLC Plus com tamanho de partículas de 3 µm podem ser usados com pressão de trabalho de até 8.700 psi. Colunas de UHPLC com tamanho de partículas de 2 µm aguentam uma rotina de até 14.500 psi de pressão de trabalho. É sempre recomendável que se trabalhe abaixo da pressão máxima de trabalho permitido para garantir uma maior vida útil da coluna.

Choques de pressão devem ser evitados. Diferenças bruscas de pressão de trabalho podem levar a formação de canais no empacotamento da coluna, o que pode resultar na quebra de picos no cromatograma correspondente. Para fases estacionárias com tamanho de poro > 200 A, a pressão máxima de trabalho pode ser menor. Entre em contato com o fabricante para ter certeza.

Fases móvel (eluentes)

Fases estacionárias com base de sílica são compatíveis com todos os solventes orgânicos na faixa de pH mencionada.

Para melhores resultados, os solventes disponíveis de melhor qualidade, de grau HPLC, devem ser usados. Todas as soluções tampão devem ser filtradas por um filtro de 0,45 µm antes de usá-las no seu cromatógrafo líquido. Mantenha sempre em mente que sua coluna vai reter qualquer material particulado que entre no fluxo do sistema. O uso de solventes impuros no HPLC provoca adsorção irreversível de impurezas na cabeça da coluna. Estas impurezas bloqueiam sítios de adsorção, mudam a seletividade da coluna e eventualmente levam a quebra dos picos no cromatograma. Na eluição com gradiente, estas impurezas geram os picos fantasmas. Picos fantasmas são picos que sempre aparecem na mesma posição no cromatograma. Sua origem não é a amostra, mas as impurezas de solventes ou outros aditivos encontrados nos solventes. Dessa forma, é altamente recomendável correr o gradiente sem injetar a amostra no início de cada método para determinar se picos fantasmas aparecem.

Para evitar adsorção irreversível na cabeça da coluna, você deve sempre usar uma pré-coluna. O uso da pré-coluna aumenta o tempo de vida da coluna de forma dramática. Além disso, a pré-coluna irá filtrar o material particulado vindo dos selos da bomba ou rotores de injeção. Uma alternativa à pré-coluna é um filtro de linha. Estes filtros são colocados entre a coluna e o injetor e novas versões podem ser montadas diretamente na coluna. Estes filtros são ótimos para remoção de material particulado do eluente, mas não conseguem substituir as pré-colunas removendo impurezas orgânicas que podem adsorver irreversivelmente à coluna.

Armazenamento apropriado de colunas cromatográficas à base de sílica

Colunas à base de sílica devem ser armazenadas com um solvente sem prótons. O melhor solvente para enchimentos de fase reversa (C18, C8, C4, C1, C30, CN e fenil) é acetonitrila/ água (50:50 v/v). O conteúdo de água não deve ultrapassar 50%. O melhor solvente de estocagem para enchimentos de fase normal (sílica, diol, nitro, ciano e amino) é hexano/ isopropanol 90:10 v/v. O melhor solvente de estocagem de colunas HILIC (HILIC, amino e sílica) é acetonitrila/ água (90:10 v/v) ou acetonitrila/ 5mM acetato de amônia, pH 5,3 (90:10 v/v). O conteúdo de acetonitrila deve ser sempre superior a 90%.

CUIDADO!

Soluções tampão de sal podem entupir as colunas e os capilares do cromatógrafo líquido. Elas não são solúveis em acetonitrila. Até para uma armazenagem rápida, lave toda a solução tampão da coluna para prevenir crescimento de algas. Certifique-se que todas as soluções tampão foram lavadas da coluna antes de trocar fases móvel aquosas por solventes orgânicos.

Tempo de equilíbrio

O tempo de equilíbrio da coluna depende das dimensões da coluna. Em geral, a coluna é equilibrada depois que 20 volumes da coluna foram passados por ela.

Os tempos de equilíbrio das dimensões mais comuns de coluna estão resumidos na tabela a seguir. Você pode reduzir o tempo de equilíbrio simplesmente aumentando a vazão. Entretanto, certifique-se de lavar a coluna com pelo menos 10 a 20 volumes para garantir que a coluna foi equilibrada.

Dimensão da Coluna	Volume da Coluna [ml]	Vazão [ml/min]	Tempo de Equilíbrio [min]
250 x 4.6 mm	2.91	1.00	58
150 x 4.6 mm	1.74	1.00	35
100 x 4.6 mm	1.16	1.00	23
50 x 4.6 mm	0.58	1.00	12
250 x 4.0 mm	2.20	1.00	44
125 x 4.0 mm	1.10	1.00	22
250 x 2.0 mm	0.55	0.25	44
150 x 2.0 mm	0.33	0.25	26
50 x 2.0 mm	0.11	0.25	9

Regeneração de uma coluna

Recomendamos a regeneração de uma coluna se for observada a alteração no formato do pico, resolução ou aumento na pressão de trabalho. Se a pressão do sistema começar a subir, remova a coluna e verifique o sistema para determinar se o aumento de pressão se deu por causa do sistema ou da coluna.

Aumento de pressão causado pelo sistema: lave o sistema, troque os filtros dos eluentes, filtros de linha e/ou capilares.

Aumento de pressão causado pela coluna: inverta a coluna e lave-a com cuidado para remover formação de partículas no filtro de entrada (conecte a saída da coluna à bomba/ injetor e lave). Não conecte a coluna ao detector.

Regeneração de embalagens RP (C18, C8, C4, C1, C30, CN e fenilo Fases estacionárias):	**Solução de problemas (Sílica, Diol, Nitro, Ciano e Amino Fases estacionárias):**
• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna de água	• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna de Heptano
• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna de Acetonitrilo	• Lavar a coluna com 5 volumes de coluna capturada de Isopropanol
• Lavar a coluna com 5 volumes de coluna Capturada de Isopropanol	• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna de Acetonitrilo
• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna De Heptano	• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna de água
• Lavar a coluna com 5 volumes de coluna Capturada de Isopropanol	• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna de Acetonitrilo
• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna de Acetonitrilo	• Lavar a coluna com 5 volumes de coluna capturada de Isopropanol
• Lavar a coluna com 20 volumes de coluna de Heptano	Substitua a coluna por uma nova do mesmo tipo para confirmar que a causa do problema é a coluna. Descarte a coluna antiga se os procedimentos de regeneração não forem bem-sucedidos.

Imagem - fonte: http://analyteguru.com/hplc-column-for-glycan-separation-by-size-polarity-and-charge/